

353

FACULTE DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1905

N°

THÈSE

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le mercredi 31 mai 1905, à 1 heure.

PAR

Joseph LEMANISSIER

Ancien externe des hôpitaux de Paris
Médaille de bronze de l'Assistance publique

L'ÉTUDE

DES

CORPS ULTRA-MICROSCOPIQUES

Président : M. ROGER, Professeur.

Juges MM. {
BLANCHARD, Professeur.
TEISSIER, Agrégé.
BALTHAZARD, Agrégé

Le Candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical

PARIS

LIBRAIRIE MÉDICALE ET SCIENTIFIQUE

JULES ROUSSET

1, RUE CASIMIR-DELAVIGNE ET 12, RUE MONSIEUR-LE-PRINCE
(anciennement 36, rue Serpente.)

1905

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Doyen	M DEBOVE.
Professeurs	MM
Anatomie	POIRIER.
Physiologie	CH. RICHET.
Physique médicale	GARIEL.
Chimie organique et chimie minérale	GAUTIER.
Histoire naturelle médicale	BLANCHARD.
Pathologie et thérapeutique générales	BOUCHARD
Pathologie médicale	HUTINEL
Pathologie chirurgicale	BRISSAUD.
Anatomie pathologique	LANNELONGUE.
Histologie	CORNIL.
Opérations et appareils	MATHIAS DUVAL
Pharmacologie et matière médicale	RECLUS.
Thérapeutique	POUCHET
Hygiène	GILBERT
Médecine légale	CHANTEMESSE.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	BROUARDEL.
Pathologie expérimentale et comparée	DEJERINE.
	ROGER.
	HAYEM
Clinique médicale	DIEULAFOY.
	DEBOVE.
	LANDOUZY.
Maladies des Enfants	GRANCHER
Clinique de pathol. mentale et des malad. de l'encéphale	JOFFROY.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GAUCHER.
Clinique des maladies du système nerveux	RAYMOND.
	LE DENTU
Clinique chirurgicale	TERRIER.
	BERGER.
	DE LAPERSONNE
Clinique ophtalmologique	GUYON
Clinique des maladies des voies urinaires	PINARD.
Clinique d'accouchements	BUDIN.
Clinique gynécologique	POZZI.
Clinique chirurgicale infantile	KIRMISSON

Agrévés en exercice.

MM.	MM	MM	MM
AUVRAY.	DUPRE	LEGRY.	PROUST.
BALTHAZARD.	DUVAL.	LEGUEU.	RENON.
BRANCA	FAURE.	LEPAGE.	RICHAUD
BEZANÇON.	GOSSET.	MACAIGNE.	RIEFFEL (chef des
BRINDEAU.	GOUGET.	MAILLARD.	travaux anatomiques.
BROCA André.	GUIART.	MARION.	TEISSIER.
CARNOT.	JEANSELME.	MAUCLAIRE.	THIROLOIX
CLAUDE.	LABBE.	MERY.	VAQUEZ.
CUNEO.	LANGLOIS.	MORESTIN.	WALLICH.
DEMELIN.	LAUNOIS.	POTOCKI.	
DEGREZ.			

Par délibération en date du 8 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A LA MÉMOIRE DE MON NEVEU

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR ROGER

Professeur de pathologie expérimentale et comparée,
Médecin de l'hôpital de la Charité.

Nous adressons à notre maître, M. le docteur Lesage et à M. Dongier, tous nos remerciements, pour la bienveillance dont ils ont fait preuve à notre égard, en nous prodiguant leurs conseils pour cette thèse, en nous laissant disposer de leur laboratoire, et en nous autorisant à produire ici des documents inédits, qu'ils publieront prochainement.

A MES MAITRES DE CAEN

MM. LES DOCTEURS AUVRAY, BARETTE, GIDON,
MOUTIER, NOURY.

A MES MAITRES DES HOPITAUX DE PARIS

(*Externat 1902-1903*).

M. LE PROFESSEUR TILLAX

de mémoire vénérée.

(*Externat 1902-1903*).

M. LE DOCTEUR BOISSARD

Accoucheur à l'hôpital Tenon.

(*Externat 1903-1904*).

M. LE DOCTEUR DU CASTEL

Médecin de l'hôpital Saint-Louis.

(*Externat 1904-1905*).

M. LE DOCTEUR LESAGE

Médecin de l'hôpital Hérold.

M. LE DOCTEUR ROCHON-DUVIGNEAUD

Ophtalmologiste des Enfants-Malades

INTRODUCTION

Chaque jour, les méthodes d'investigation deviennent plus nombreuses et se précisent davantage. Nous nous proposons, dans ce travail, de décrire et de discuter une technique nouvelle susceptible, à notre avis, de fournir une ample moisson de résultats intéressants.

Le microscope, permettant de découvrir, d'analyser, de comparer des objets qui échapperaient aux recherches les plus minutieuses, devait avoir une influence considérable sur les progrès de la biologie. La bactériologie lui doit ses plus belles découvertes. L'anatomie a été complètement transformée, sinon créée par son usage. En physiologie, le microscope a permis d'étudier la composition morphologique des milieux organiques ; sans lui, on ne connaîtrait pas les mouvements amiboïdes, les phénomènes de la contraction, ceux des sécrétions glandulaires et de la desquamation épithéliale.

En pathologie, les études microscopiques nous donnent le moyen de suivre les processus morbides dans les différents tissus. En clinique, elles facilitent le diagnostic et le pronostic, en permettant l'examen des humeurs telles que le sang, l'urine, le pus, les crachats.

Un instrument aussi précieux, pour répondre aux exi-

gences toujours croissantes de la science, devait être sans cesse l'objet de nouveaux perfectionnements. Ceux-ci ont porté sur toutes les parties de l'appareil. En même temps que les détails de construction en rendaient l'emploi plus commode, les défauts d'aplanetisme et d'achromatisme étaient bien corrigés et la vision des images devenait plus nette, par l'emploi d'objectifs à grande ouverture numérique et de dispositifs d'éclairage perfectionnés. Grâce à l'heureuse collaboration de constructeurs et de physiciens, des corps de plus en plus petits purent être bien étudiés, et des structures de plus en plus délicates devinrent nettement définies.

Certains faits bien connus dans les différentes branches de la science, démontraient cependant l'existence d'objets que les plus forts grossissements ne pouvaient mettre en évidence. « Par malheur, disait, tout récemment encore, un éminent physicien, nos microscopes actuels ne peuvent pas dépasser une certaine limite dans l'observation des corps de dimensions de plus en plus réduites, et nous savons aujourd'hui que nos successeurs ne seront guère mieux pourvus : la nature de la lumière oppose un obstacle infranchissable aux progrès ultérieurs et nous devons renoncer à l'espérance de voir un jour les phénomènes et les êtres que leur petitesse dérobe actuellement à nos yeux ».

En effet, le pouvoir de définition du microscope ne peut pas être accru indéfiniment. Sans entrer dans le détail des considérations théoriques, disons simplement que la plus petite distance qui doit séparer deux points pour que leurs images soient distinctes est égale à la longueur

d'onde lumineuse divisée par la valeur numérique de l'objectif employé. Cette valeur numérique a pu, dans certains microscopes à immersion, être représentée par un nombre voisin de 4 ; elle ne paraît plus susceptible d'être augmentée.

Par conséquent, si un corps tout entier a des dimensions inférieures à un quart de longueur d'onde, c'est-à-dire environ un huitième de micron, il est impossible d'y apercevoir le moindre détail, d'étudier sa forme par exemple. Pour des dimensions plus petites encore, les objets ne peuvent plus former que des taches absolument confuses et noyées dans le champ du microscope éclairé par transparence.

Le pouvoir des objectifs étant proportionnel à la longueur d'onde employée, A. Kohler (1) et von Rohr ont fait construire par la maison Zeiss des appareils permettant d'utiliser les rayons ultra-violets dans l'étude des objets ultra-microscopiques. Mais le procédé comporte d'assez grosses difficultés. On est obligé de remplacer l'observation à l'œil par la photographie. En outre, le choix même de la source et de lentilles transparentes pour les rayons choisis rendent la méthode d'une pratique peu courante. Toujours est-il que la substitution de rayons ultra-violets à l'éclairage ordinaire peut augmenter du double le pouvoir résolvant du microscope.

Nous n'insisterons pas sur ce procédé qui peut être appelé à rendre de grands services ; nous nous contenterons de le mentionner à côté d'une autre méthode, mise

(1) A. Kohler. *Rev. gén. des sciences*, 28 février 1905.

en œuvre par deux physiiciens allemands Siedentopf et Zsigmondy, et reprise un peu plus tard en France par Cotton et Mouton qui en ont modifié la technique. C'est cette méthode que nous nous proposons d'étudier dans cette thèse.

Nous consacrerons un premier chapitre à la description de la méthode elle-même et des divers appareils permettant de l'utiliser. Nous verrons ensuite ses principales applications, en particulier celles qui ont trait à l'étude des colloïdes.

PREMIÈRE PARTIE

LA MÉTHODE D'EXAMEN ULTRAMICROSCOPIQUE

C'est en 1903 que Siedentopf et Zsigmondy ont eu l'idée d'appliquer à l'étude des corps ultramicroscopiques des données déjà connues depuis longtemps. On savait en effet, que la difficulté de percevoir au microscope ordinaire les objets de trop petites dimensions réside principalement dans ce fait que les images s'effacent devant les rayons directement transmis par l'éclairage. En supposant un instant que les objets à étudier soient lumineux par eux-mêmes, on pourrait se dispenser de tout éclairage ; les rayons émis par ces objets, sans nous faire connaître leur forme et leurs détails de constitution, nous permettraient au moins de constater leur existence. Une comparaison s'impose : « Nous voyons même à l'œil nu les étoiles dont le diamètre apparent est inférieur au pouvoir séparateur des plus grands télescopes, mais nous n'avons aucun renseignement sur leur forme et leur configuration extérieure. Seules la coloration et l'intensité des rayons qu'elles nous envoient nous permettent de les différencier et de les classer en divers groupes. En outre nous ne voyons les étoiles à l'œil nu que la nuit, parce qu'elles

s'effacent pendant le jour, sur le fond de l'atmosphère éclairée (1) ».

Siedentopf et Zsigmondy ont fait remarquer, que s'il n'existe pour ainsi dire pas de corps lumineux par eux-mêmes, on peut arriver à quelque chose d'analogue en les éclairant vivement. Un petit corps *opaque* très vivement éclairé diffracte de la lumière dans tous les sens et se comporte à peu près comme une source. C'est ce phénomène que l'on est à même d'observer dans l'expérience de Tyndall : un faisceau de lumière, passant à travers une chambre obscure, nous permet de voir à l'œil nu les poussières très petites.

Tel est le principe de la méthode de Siedentopf et Zsigmondy. On prévoit qu'ici le grossissement du microscope, n'intervient plus directement. Les corps ultra microscopiques pourraient être vus, même à l'œil nu, s'ils étaient assez lumineux ; le microscope ne sert qu'à recueillir plus de lumière et à séparer les points brillants les uns des autres. « Aussi, dans les recherches ultra microscopiques, l'emploi d'un instrument puissant ne s'imposera-t-il que lorsque les points seront très nombreux, de même que les lunettes douées d'un grand pouvoir séparateur seront nécessaires pour résoudre certaines étoiles doubles ou certaines nébuleuses. »

L'intensité des rayons diffractés n'est jamais considérable et il convient de les utiliser le mieux possible ; c'est en effet le manque de lumière, comme l'ont fait observer Siedentopf et Zsigmondy, qui fixe une nouvelle limite à la

(1) Cotton et Mouton. — *Rev. gén. des Sciences*, 15 décembre 1903.

petitesse des corps ultra-microscopiques. En concentrant à l'aide d'une lentille le faisceau éclairant, on augmente l'intensité des rayons diffractés. En outre, Gouy a démontré que cette intensité décroît à mesure que l'on s'écarte de la direction des rayons directement transmis. Nous verrons comment cette constatation a été mise à profit par Cotton et Mouton.

On conçoit que *seuls les rayons diffractés doivent venir impressionner l'œil de l'observateur*. Aucun des rayons du faisceau éclairant ne doit pénétrer directement dans le microscope, d'où la nécessité de donner à l'éclairage une direction perpendiculaire ou oblique par rapport à l'axe du microscope.

Une seconde condition est également nécessaire ; c'est de *n'éclairer à la fois qu'un nombre suffisamment faible de petites particules à examiner*.

Il est très utile pour l'observation, que la profondeur du champ éclairé soit aussi mince, s'il est possible, que la profondeur du champ du microscope. En effet, s'il existe des particules éclairées, en dehors de cette région de très faible profondeur que l'œil peut mettre au point, ces sources lumineuses ne donneront plus pour images de petites taches, mais de larges cercles diffus, qui, pour peu que les sources de cette nature soient nombreuses, se superposeront les unes aux autres et couvriront le fond d'un éclairage uniforme, dans lequel seront noyées les images nettes.

Lorsque le champ est ainsi éclairé sur une profondeur très faible et que les dimensions des particules sont sensiblement égales, l'œil perçoit leurs images sous forme de

petites taches lumineuses, d'éclat à peu près semblable. L'éclat varie au contraire suivant la grandeur des particules. Si l'appareil, étant disposé pour voir des objets de 6 $\mu\mu$ (1) environ, on amène dans le champ une particule de 0,1 micron, son éclat est tel, que l'œil ébloui est obligé de prendre quelque repos, avant de pouvoir compter ensuite des particules sensiblement plus petites. Aussi, peut-on, avec quelque habitude, se faire une idée de la différence de diamètre des corpuscules par les différences d'éclat de leurs images.

Pour compléter l'exposé de la méthode, il nous reste à décrire les différents appareils permettant de l'utiliser.

Appareil de Siedentopf et Zsigmondy.

Cet appareil construit par la maison Zeiss, qui nous a fourni les clichés reproduits ici, est destiné surtout à l'examen des liquides.

Il comporte : 1° *un dispositif d'éclairage* ; 2° *un dispositif d'observation*.

Le tout repose sur un dessus de table a (fig. 1) muni d'un banc d'optique b, de 1 mètre de long.

DISPOSITIF D'ÉCLAIRAGE. — Comme source d'éclairage, on peut utiliser soit la plus puissante, *la lumière solaire*, qu'on envoie horizontalement dans l'appareil au moyen d'un héliostat, soit un *régulateur automatique* à arc, c, placé à l'une des extrémités du dessus de table.

(1) $\mu\mu$ représente un millième de micron, soit un *millionième* de millimètre.

Les rayons, issus de la source, doivent passer dans un premier *objectif à projection*, *f*, de 80 centimètres de foyer, dont on règle la position en le déplaçant sur le banc d'optique. La face frontale de l'objectif doit être tournée vers le microscope.

Une *fente de précision*, *g*, fait suite à l'objectif de pro-

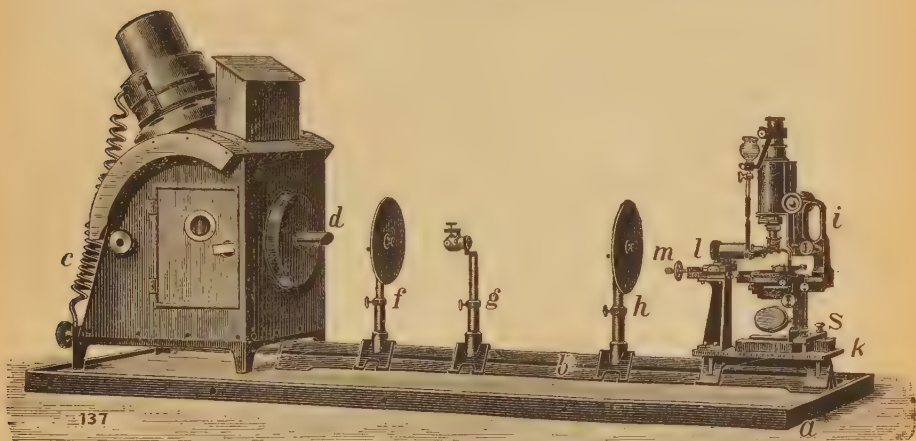


Fig. 1. — Appareil de Ziedentopf et Zsigmondy.

jection. Elle se déplace également le long du banc, jusqu'à ce que l'objectif de projection, *f*, forme une image réelle de la source lumineuse dans son plan. L'ouverture de la fente est réglée par un tambour, *c*, divisé en 50 parties : un tour complet du tambour fait varier l'épaisseur de la fente d'un demi-millimètre, sa longueur peut être réglée à volonté par deux volets. Le système ainsi constitué est susceptible de tourner de 90°, ce qui permet de donner à la fente une direction alternativement horizontale et verticale.

Au point *h*, à 14 centimètres environ de la fente, se

trouve un deuxième *objectif de projection* de 55 millimètres de foyer, également monté sur un patin. Sa face frontale est, comme celle du premier objectif, tournée vers le microscope. Son rôle est de donner une image réduite de la fente dans le plan de l'objectif de microscope AA.

Cet objectif AA sert à éclairer directement la préparation. Quand il est bien placé, sa frontale se trouve à 1 millimètre environ de la monture de l'objectif D utilisé pour l'observation.

DISPOSITIF D'OBSERVATION. — Placé à l'extrémité du dessus de table, il est constitué essentiellement par :

A) Une *statif* ordinaire de microscope i, qui est monté au moyen d'un étrier J sur la plaque base K. Cette plaque base porte en outre le *chariot*, l, qui est mobile dans deux directions et sert à centrer par rapport à l'objectif D du microscope, l'objectif d'éclairage AA.

B) L'objectif D du microscope, qui est monté sur le tube, a, au moyen d'un changeur d'objectif à coulisse. C'est un objectif à immersion achromatique qui, en vertu de sa constitution spéciale, ne fournit une large image parfaitement nette qu'au centre de son champ.

C) Sur cet objectif D, est fixée, au moyen d'un *porte-cellule* spécial, la *cellule* contenant le liquide à examiner. La *cellule* possède deux fenêtres en quartz ; l'une sera tournée vers la source lumineuse, l'autre devra être parallèle à la face inférieure de la lentille frontale.

D) Les extrémités de la cellule sont reliées par des tubes en caoutchouc, d'une part à l'entonnoir g, qui amène le liquide, d'autre part au *tuyau d'écoulement* h (fig. 2),

qu'on peut ouvrir ou fermer selon les besoins. L'entonnoir est fixé au moyen du porte-entonnoir, *e*, qu'on glisse sur le porte-oculaire du microscope.

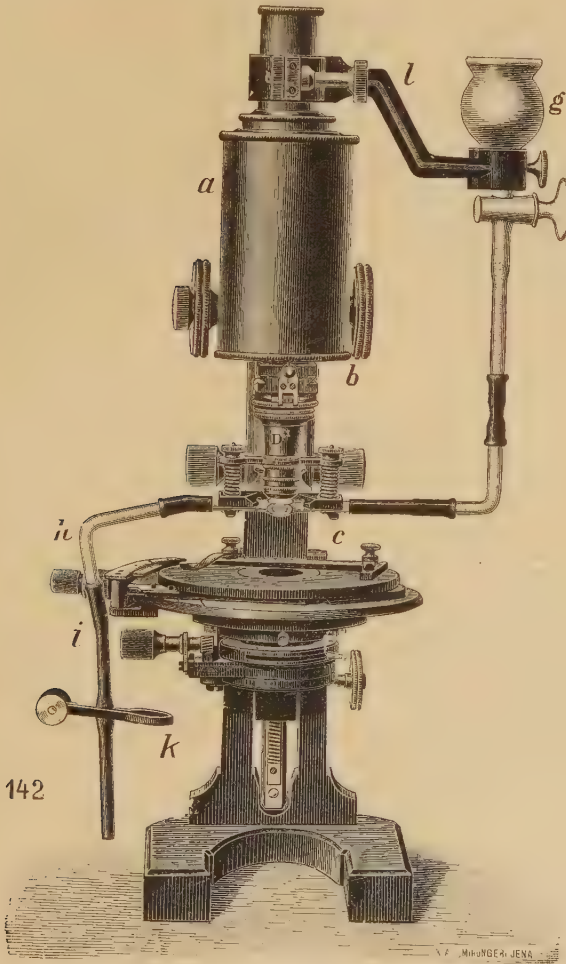


Fig. 2. — Microscope avec tube, entonnoir et cellule.

Lorsqu'il s'agit d'évaluer le nombre des particules mises en évidence, il importe de connaître le volume du liquide éclairé : la fente d'éclairage ayant une direction horizontale on détermine d'abord la largeur à l'aide de l'oculaire micromètre comme l'indique la figure 3.

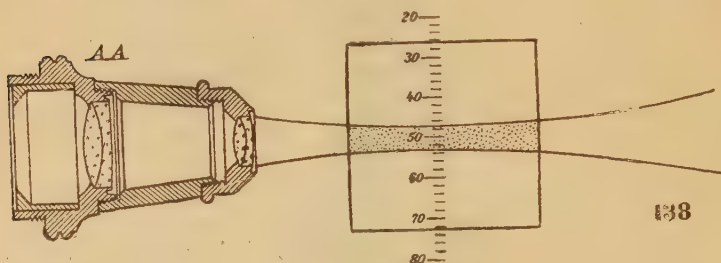


Fig. 3. — Détermination de la largeur et de l'épaisseur de la fente.

Puis on donne à la fente une direction verticale en la faisant tourner de 90 degrés. La largeur de la fente correspondant cette fois à l'épaisseur du champ éclairé, se pro-

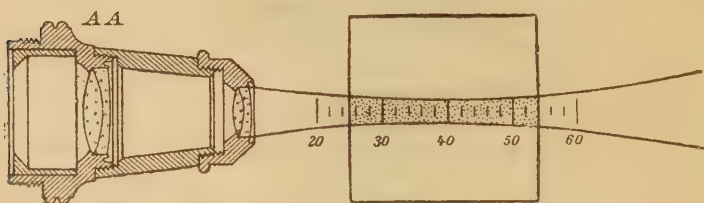


Fig. 4. — Détermination de la longueur.

jette de gauche à droite. Une deuxième lecture à l'oculaire micromètre fournit immédiatement cette épaisseur.

Il reste à connaître la longueur qu'on obtient en faisant tourner le micromètre dans la position indiquée par la figure 4.

On peut remplacer la division de l'oculaire par un réseau à mailles carrées : la surface des mailles étant connue, celles-ci délimitent dans le liquide, des volumes dont la capacité est facile à calculer.

Enfin sur l'oculaire se place l'analyseur servant à observer la polarisation de la lumière diffractée par les corps ultra microscopiques. La lumière est d'autant mieux polarisée, dans le plan passant par les axes du faisceau éclairant et du faisceau diffracté que les particules sont plus petites. L'analyseur sert en outre à distinguer la lumière fluorescente non polarisée, de la lumière diffractée.

Appareil de Siedentopf.

Siedentopf a fait en 1903 à la Royal Society de Londres une communication relative à un autre dispositif qu'il a fait construire par la maison Zeiss. Cet appareil comporte une exception à l'une des règles énoncées plus haut (voir page 13), car ici le principe de l'éclairage à fond noir se trouve réalisé par le procédé ordinaire qui fait coïncider les axes du faisceau éclairant et du faisceau diffracté.

Dans le cas présent, le rôle fondamental appartient à l'objectif d'observation. D'après une idée du professeur Abbe, cet objectif a été diaphragmé, de façon à ne laisser passer que les rayons diffractés.

L'appareil représenté figure 5, possède un objectif d'une ouverture numérique égale à 1,30. Au centre de la len-

tille frontale, on a enlevé une calotte correspondant exactement à 0,3 d'ouverture numérique, et le plan ainsi obtenu a été noirci. De cette façon, les rayons dont l'ouverture numérique est comprise entre 0,3 et 1,3 sont les seuls à pouvoir traverser l'objectif.

Dans certains cas, lorsque le diaphragme fixe est impos-

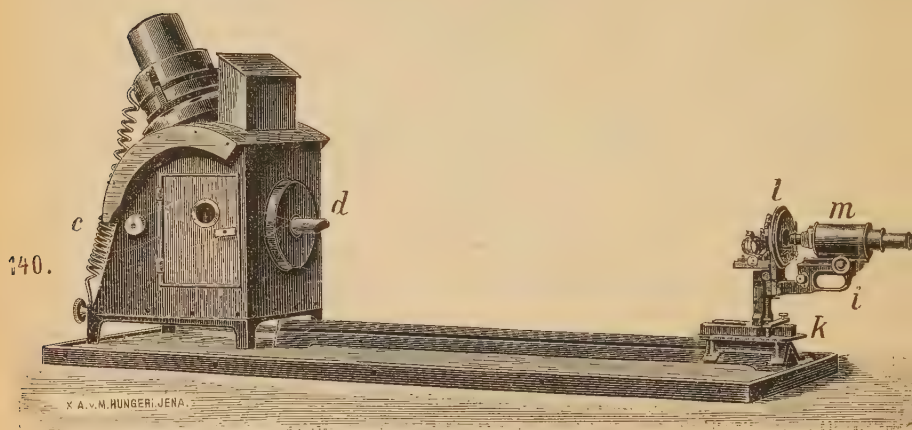


Fig. 5. — Appareil de Siedentopf.

sible à réaliser, on peut adopter un diaphragme central se vissant dans l'objectif.

Avec le condensateur ordinaire à trois lentilles, on ne saurait obtenir un éclairage à fond noir parfait; c'est pourquoi l'on emploie comme condensateur un objectif spécial qui fournit un cône d'éclairage central ayant une ouverture numérique de 0 à 0,2.

Dans ces conditions les rayons qui arrivent à l'objectif sans avoir été diffractés sont tous arrêtés par le diaphragme de la lentille frontale.

L'objectif diaphragmé peut encore servir pour les ob-

servations ordinaires à fond clair. L'appareil d'éclairage est constitué par un condensateur échangeable permettant de passer rapidement de l'éclairage ordinaire à l'éclairage à fond noir ; il suffit dans ce cas de substituer l'objectif spécial au condensateur ordinaire à trois lentilles.

L'appareil de Siedentopf est destiné à l'examen de préparations entre lames et lamelles ; il est surtout applicable à l'observation des bactéries ultra-microscopiques, mais il ne peut servir lorsqu'il s'agit d'étudier des tissus irréguliers, pas plus d'ailleurs que les autres appareils de ce genre. Son principal avantage, est de rendre plus perceptibles à l'œil des corps dont les dimensions oscillent entre $1/10$ et $3/10$ de μ , et se trouvent par conséquent sur la limite des grandeurs visibles au microscope.

Outre les appareils décrits précédemment, plusieurs constructeurs, Leitz entre autres, ont réalisé pour l'examen des corps ultra-microscopiques des dispositifs pouvant s'adapter à leurs microscopes.

Appareil de Cotton et Mouton.

Cotton et Mouton ont pensé que surtout pour l'étude des liquides on pourrait réaliser un dispositif plus facile à construire et plus maniable, satisfaisant cependant aux conditions physiques requises.

L'appareil, tel que les auteurs l'ont décrit eux-mêmes, modifie très peu le microscope ordinaire et n'exige

pas une technique très différente de celle qu'emploient couramment les micrographes. « Son principe est le suivant : étant donné une préparation placée comme à l'ordinaire, entre une lame et une lamelle, si l'on éclaire cette préparation à l'aide d'un faisceau très oblique arrivant par dessous, les rayons de ce faisceau en subiront la réflexion totale sur la face supérieure du couvre-objet en contact avec l'air, et seront rejetés vers le bas. Aucun d'eux ne pourra pénétrer directement dans le microscope dont le champ restera obscur. Seules les petites particules qui rompent l'homogénéité du milieu observé diffracteront de la lumière, en enverront de tous côtés et principalement dans le microscope. »

On peut réaliser de bien des manières un appareil permettant de produire un tel mode d'éclairement. Celui dont se sont servi Cotton et Mouton, offre sur d'autres dispositifs, peut-être théoriquement plus simples, l'avantage de ne pas modifier le moulage du microscope et d'obliger seulement à en relever le tube pour l'observation. Il est formé d'un bloc de verre, taillé en forme de parallépipède oblique à base rectangle ; sa hauteur est de 8 à 10 millimètres et ses faces obliques font avec la base un angle d'environ 51 degrés. Un appareil éclaireur est placé devant le microscope et envoie sur la face oblique du parallépipède, un faisceau convergent dont l'axe est à peu près perpendiculaire à cette face.

Ce faisceau subit une première réflexion totale sur la face intérieure du bloc de verre. Renvoyé en haut, il le traverse dans toute sa masse, traverse également la lame porte-objet qui repose sur le bloc avec interposition d'une

goutte de liquide de même indice, traverse enfin le liquide en expérience, le couvre-objet, et arrivant à la face supérieure de celui-ci, subit une deuxième réflexion totale qui le renvoie vers le bas, à travers les mêmes milieux. Sa convergence est telle que l'image de la source vient se former dans

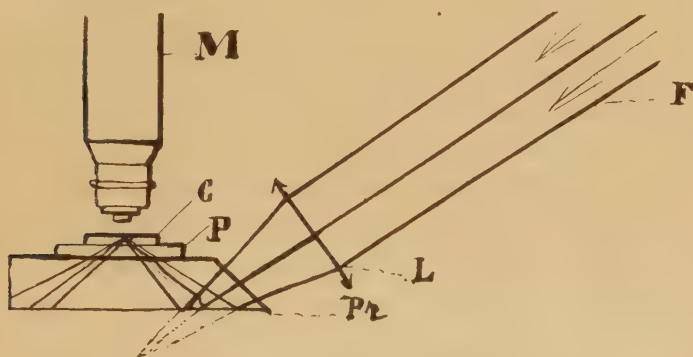


Fig. 6. — Schéma représentant la marche des rayons : **F** Faisceau lumineux. **L** Lentille convergente. **P** Prisme. **P** Lame. **C** Lamelle. **M** Microscope.

le liquide à observer, et cela précisément dans l'axe du microscope observant.

On voit que si les angles, que font avec la verticale les rayons extrêmes du faisceau lumineux, ont été convenablement choisis, ces rayons pénètrent dans la préparation, mais aucun d'eux ne peut parvenir jusqu'à l'objectif et seule la lumière diffractée par les particules, vient en donner dans l'appareil une image vivement éclairée. On peut employer un objectif quelconque, par exemple un fort objectif à sec, d'ouverture numérique voisine de l'unité, mais non, bien entendu, un objectif à immersion : on ne pourrait évidemment s'en servir sans supprimer cette réflexion qui est, somme toute, le phénomène utilisé ».

Un avantage important de ce dispositif réside dans ce fait qu'il permet d'employer une très grande partie des rayons émis par la source. Siedentopf et Zsigmondy sont obligés de perdre beaucoup de lumière pour n'éclairer qu'une couche très mince du corps en expérience. Dans le procédé de Cotton et Mouton, cet inconvénient se trouve écarté si l'on a soin de prendre une préparation très mince de liquide. On obtient aussi plus de lumière, parce qu'on utilise des rayons diffractés moins écartés de la direction moyenne du faisceau éclairant.

Grâce à l'éclairement intense ainsi obtenu, Cotton et Mouton ont pu faire, même avec la lampe Nernst, un certain nombre d'observations. Ils ont employé aussi d'autres sources lumineuses telles que l'arc au mercure et l'arc ordinaire; quelquefois aussi, par un temps favorable, le soleil, dont l'éclat supérieur à celui de toutes les autres sources, donne aux phénomènes observés, leur maximum d'intensité.

L'appareil dont nous nous sommes servi, a été installé par M. Dougier, d'après les données de Cotton et Mouton.

Comme source d'éclairage, M. Dongier emploie la lampe à arc « Liliput », de Siemens et Halske, très avantageuse en ce sens que, fonctionnant avec une intensité de courant de deux ampères, elle peut être branchée sur une prise de lampe à incandescence. La lampe repose sur l'extrémité d'une table par l'intermédiaire d'une plateforme montée sur un pivot mobile de bas en haut, ce qui permet de toujours maintenir à une hauteur convenable, le point incandescent; car celui-ci se trouverait à un mo-

ment donné trop bas placé, par suite de l'usure des charbons. Lorsque l'appareil est réglé pour le fonctionnement, l'arc se trouve surélevé de 1 mètre environ, par rapport à la platine du microscope placé à l'autre extrémité de la table.

Ce microscope qui ne diffère en rien du microscope ordinaire, est fixé sur une plateforme munie d'un trépied à vis calantes, ce qui a permis de disposer la platine du microscope dans un plan, non pas horizontal, mais largement incliné en regard de la lampe.

Sur la platine mobile du microscope se place le bloc de verre destiné à produire la réflexion totale et qu'on se procure sous le nom de *glace pour la visée des objets ultra-microscopiques*. C'est somme toute un parallépipède de Fresnel, avec cette différence qu'une seule des deux faces obliques a été conservée ; c'est elle qui doit recevoir le faisceau lumineux (voir Fig. VI). La face opposée est verticale et s'applique comme le repère de la platine mobile.

Entre le microscope et la lampe, sur le trajet des rayons, est interposée une *lentille convergente* d'une distance focale de 15 centimètres. Cette lentille, montée sur un support universel, est destinée à concentrer le faisceau lumineux et à lui donner un diamètre tel qu'il puisse pénétrer tout entier dans la face oblique de la glace à réflexion totale. Elle permet en outre de former dans le plan de la préparation l'image réelle du charbon positif incandescent.

Le réglage de la lentille est une opération assez délicate. Nous avons vu que le faisceau lumineux, après avoir traversé de bas en haut la glace et la préparation, vient

finalement se réfléchir au niveau de la face supérieure du couvre-objet, mais il s'y réfléchit sur une très petite surface, au centre de laquelle doit passer l'axe de visée du microscope. Celui-ci étant immobile, on conçoit la difficulté qu'on éprouve parfois à bien disposer la lentille, si l'on songe que l'image réelle de la source doit, elle aussi, se former à proximité de l'axe du microscope.

Examen des préparations

L'examen des préparations se fait comme à l'ordinaire. On place une goutte du liquide à examiner entre une lame et une lamelle, de façon à obtenir une préparation très mince. On verse sur la face supérieure de la glace une goutte d'essence de cèdre, liquide ayant même indice que le verre, puis on y dépose la préparation. L'essence de cèdre s'étale entre le prisme et la lame, constituant ainsi un système que les rayons doivent traverser sans être déviés. Il suffit alors de mettre au point le microscope.

Ce dispositif permet aussi d'observer comme à l'ordinaire, c'est-à-dire par transparence : il suffit de disposer une lampe devant le microscope et d'éclairer à l'aide du miroir placé au-dessous de la platine ; on n'a presque pas à changer la mise au point. C'est là un moyen de contrôle très précieux permettant de vérifier d'une façon sûre, si l'on a affaire ou non à des corps ultra-microscopiques. On ne saurait, pour l'éclairage direct, se servir du condenseur ordinaire, car les rayons ne convergeraient plus sur la préparation qui se trouve surélevée de toute la hauteur du

prisme. Il faudrait donc avoir recours à un condensateur spécial, au cas où l'on voudrait s'en servir.

Choix des accessoires

L'une des principales difficultés de l'examen ultra-microscopique réside donc dans le choix et la préparation des accessoires : le prisme, les lames, les lamelles, le pipettes dont on se sert pour prélever les échantillons peuvent être chargés de poussières microscopiques et ultra-microscopiques. Ces poussières apparaissent sous forme de points lumineux et pourraient être une cause d'erreur qu'il faut éviter. Aussi sous les objets en question, doivent-ils être rigoureusement nettoyés et conservés autant que possible à l'abri de l'air.

Nous les lavons à l'alcool absolu en ayant soin de bien les essuyer ensuite avec du papier absorbant très propre.

Malgré ces précautions, on n'obtient pas une préparation absolument pure, les moindres défauts du verre, tels que les pailles, les bulles gazeuses, en gênant la marche des rayons, donnent aussi naissance à des taches lumineuses. De même, les plus petites rayures à la surface du prisme et des portes-objets, bien qu'elles soient absolument invisibles à l'œil nu, apparaissent sous forme de stries vivement éclairées. Ce fait a même suggéré à Cotton et Mouton, l'idée d'utiliser la méthode à l'étude des figures de corrosion ou des irrégularités pouvant exister à la surface des cristaux.

On arrive facilement à différencier les particules ultra-

microscopiques des taches lumineuses produites dans ces conditions : les premières paraissent avoir des dimensions beaucoup plus petites, et dans les liquides sont animées de mouvements browniens ; les secondes sont immobiles mais elles n'en constituent pas moins une gêne qu'il y aurait intérêt à supprimer.

Dans ce but, Cotton et Mouton prennent comme porte-objet des morceaux de glace nettoyés chimiquement et pour couvrir-objets des lames minces et fraîchement clivées de mica.

Nous nous sommes contenté le plus souvent de lames et lamelles ordinaires en choisissant celles qui extérieurement nous ont paru les plus nettes et qui se trouvaient être les plus minces. Dans tous les cas, elles n'ont pu nous servir qu'une fois.

Les dilutions qu'on est obligé de faire subir aux liquides pour les examiner, constituent encore une sérieuse difficulté de technique. Il est évidemment nécessaire pour la dilution et la comparaison d'employer des liquides tout à fait dépourvus de particules ultra-microscopiques et l'on en trouve même dans l'eau distillée qui n'a pas été préparée et conservée avec des soins spéciaux.

L'emploi des colorants qui jouent un si grand rôle dans la technique microscopique ordinaire, ne nous a pas paru appelé à rendre de grands services ici. Nous avons essayé de colorer les préparations à l'aide de réactifs les plus employés tels que la fuchsine, l'éosine, l'iode, le laudanum. Ces colorants, outre les précipités qu'ils peuvent

former au sein des liquides soumis à l'examen, ont l'inconvénient de rendre les préparations fluorescentes : le fond noir se trouve remplacé par un fond vivement éclairé et gênant considérablement la vision des particules.

DEUXIÈME PARTIE

APPLICATIONS DE LA MÉTHODE

Considérations générales.

Bien que d'un usage tout récent, la méthode qui vient d'être exposée a servi dans de nombreuses recherches. Il y a lieu d'espérer que les services rendus par elle aux micrographes augmentent de jour en jour mais son emploi restera toujours soumis à certaines conditions qu'il s'agit maintenant de préciser.

Le nouveau procédé ne convient évidemment qu'à l'étude des milieux transparents mais les particules ultramicroscopiques contenues dans ces milieux ne deviennent perceptibles qu'à la condition d'être assez clairsemées : les distances qui les séparent doivent être au moins égales aux dimensions que peuvent résoudre nos microscopes, autrement leurs images se confondraient.

Cette condition pourra toujours être réalisée dans les liquides par la dilution, mais les solides ne se prêteront pas toujours d'eux-mêmes à l'examen ; aussi la méthode ne paraît-elle pas applicable à l'étude des coupes histologiques par exemple.

Il est en outre nécessaire que les corps ultramicroscopi-

ques aient un indice de réfraction assez différent de celui du milieu dans lequel ils sont plongés. C'est là le plus grave inconvénient de la méthode.

Nous reviendrons plus loin sur ce sujet, à propos de l'étude des colloïdes, mais on conçoit qu'un liquide se montrant optiquement vide à l'appareil puisse ne pas être rigoureusement homogène et contenir des corps ultramicroscopiques tout à fait comparables comme dimensions à d'autres particules visibles mais d'un indice de réfraction différent.

Enfin la méthode exige que les corps ultramicroscopiques aient des dimensions supérieures à une certaine limite qui, à vrai dire, est fort petite.

L'ordre de grandeur des corps microscopiques ne peut évidemment pas être évalué directement. Les différences observées dans la coloration et l'intensité des rayons émis par les particules nous permettent bien de les différencier entre elles mais ne nous renseignent que très grossièrement sur leurs dimensions.

Siedentopf et Zsigmondy ont imaginé un procédé qui leur a permis de déterminer approximativement la grosseur moyenne des particules renfermées dans l'épaisseur des verres à l'or.

Les verres à l'or ou *verres rubis* sont obtenus en versant sur les matériaux destinés à préparer le verre ordinaire, une solution d'or dans l'eau régale. L'or qui se trouve incorporé dans ces conditions existe à l'état d'infinie division et le verre ainsi obtenu apparaît à l'œil et au microscope ordinaire comme un milieu absolument homogène. Au contraire, vu à l'ultramicroscope ce verre

montre un nombre considérable de fines particules disséminées dans son épaisseur.

L'appareil de Siedentopf et Zsigmondy leur permet de compter, à l'aide de l'oculaire micromètre, le nombre des particules distinctes qui se trouvent dans un volume donné du verre.

D'autre part ils déterminent par une analyse chimique, le poids d'or contenu dans un volume également donné. Le quotient des deux quantités rapporté à un même volume donne la masse moyenne, et de cette masse on déduit les dimensions linéaires.

Le procédé suppose donc : 1° que tout l'or est à l'état de particules distinctes et de grandeur comparable ; 2° que la densité de l'or à cet état est celle que nous lui connaissons, ce qui est d'ailleurs probable ; 3° que les particules ont des formes à peu près régulières voisines par exemple du cube ou de la sphère.

Une telle méthode ne peut donner que des mesures approximatives. Par la nature même des erreurs, les dimensions linéaires se trouvent plutôt mesurées par excès et les auteurs ne pensent pas que dans les cas les plus défavorables, ces dimensions soient plus petites que deux ou trois fois les estimations qu'ils en ont donné. En ce qui concerne les plus petites particules qui aient été nettement distinguées, Siedentopf et Zsigmondy ont obtenu des chiffres oscillant entre 4 et 7 μ , soit en moyenne 4,200.000 de millimètre.

Les auteurs ne doutent pas que certains échantillons de verre rubis ne contiennent des particules encore plus petites et ne pouvant être décelées par leur méthode. Un

calcul théorique assez grossièrement approché, leur avait montré d'ailleurs que, même si elles avaient un éclat intrinsèque égal à celui de la surface solaire, des particules plus petites n'émettraient pas assez de lumière pour donner des images perceptibles dans nos microscopes. Ainsi se trouverait atteinte la limite de visibilité ultra-microscopique.

L'étude des propriétés optiques des solutions colloïdales devait fournir un autre moyen d'évaluer l'ordre de grandeur des particules ultra-microscopiques. Toutes les solutions colloïdales diffusent et polarisent la lumière. Ces deux propriétés, diffusion et polarisation, appartiennent à tous les systèmes qui ne sont pas homogènes au sens strict du mot, c'est-à-dire dont la composition n'est pas la même en tous les points (1). Les solutions colloïdales sont toutes optiquement inhomogènes et l'on en a tiré la conséquence que toutes contiennent des particules en suspension. L'ultra-microscope a permis, comme nous le verrons, de vérifier cette hypothèse dans un grand nombre de cas, mais indépendamment de l'examen ultra-microscopique, on a cherché à calculer les dimensions des particules d'après l'étude de la polarisation.

La lumière qui a traversé une solution colloïdale est partiellement polarisée (2), et l'on conçoit que si l'hypothèse précédente est vraie, les variations observées dans ce phénomène de polarisation doivent être dûes à la nature

(1) V. Henri et A. Mayer. (*Revue générale des sciences*, novembre 1904).

(2) MM. Dongies et Lesage, en se plaçant dans des conditions favorables, ont obtenu une polarisation totale.

même des particules. Lobry de Bruyn, en se servant de considérations développées par lord Rayleigh, fait remarquer que les particules qui polarisent la lumière réfléchie et font apparaître les teintes bleu-violet, doivent être cinquante fois plus petites que la longueur d'onde de la lumière. Admettant que cette longueur est de $0,5 \mu$, on trouve pour le diamètre des particules des nombres de 5 à $10 \mu\mu$.

D'autre part, Ehrenhaft a montré que la proportion de lumière polarisée atteint son maximum dans la direction normale au faisceau éclairant lorsque les particules ne sont pas conductrices de l'électricité, ce qui a lieu pour l'acide silicique colloïdal, le sulfure d'arsenic. Au contraire, le maximum de lumière polarisé se trouve dans des conditions différentes lorsque les particules conduisent l'électricité. Les angles de polarisation sont de $118-120^\circ$ pour l'or colloïdal, de 110° pour l'argent colloïdal. L'auteur, après avoir fait remarquer que ces chiffres vérifient les prévisions de la théorie électro-magnétique de la lumière, indique que l'ordre de grandeur des particules peut être calculé d'après cette théorie. Par exemple pour l'or colloïdal, les limites entre lesquelles elles doivent être comprises sont $5.80/10^5$ et $3,3/10^7$ centimètres.

Ces chiffres qui donnent une idée de la grandeur moyenne des particules en suspension, dans une solution colloïdale donnée sont à rapprocher des évaluations obtenues par Siedentopf et Zsigmondy dans l'étude des verres à l'or, qui sont en somme des solutions colloïdales solides.

On se rend compte par ce qui précède que l'examen

ultra-microscopique convient surtout à l'étude de colloïdes ; c'est même à ce point de vue qu'il intéresse le plus la biologie, car, à part les excréments, tous les liquides organiques appartiennent à ce groupe de corps. Malheureusement les renseignements fournis par l'examen sont encore dans un grand nombre de cas très insuffisants.

On a pu se servir aussi de l'ultra-microscope pour rechercher de quelle façon se fait dans l'intimité des solutions, la destruction des corps composés et les précipitations. Pour fixer les idées, nous empruntons à Wilhem Bilz l'exemple suivant, tiré d'une étude sur le mode de précipitation du soufre. Lorsque, en présence d'un acide, il se forme dans une solution d'hyposulfite alcalin, de l'acide thiosulfurique, on sait que celui-ci, instable par excellence, se décompose et qu'il se forme toujours un précipité de soufre. Or, à peine a-t-on effectué le mélange d'acide et d'hyposulfite, si l'on vient à la neutraliser avec un alcali, il se produit cependant une mise en liberté de soufre, bien que l'on n'observe aucun changement apparent dans la liqueur. L'auteur a voulu savoir à quel état se trouvait le soufre en formation avant l'apparition du précipité. S'agissait-il d'une solution vraie ou d'une solution colloïdale ? L'examen ultra-microscopique lui a permis de résoudre la question en faveur de la première hypothèse. Au début de la réaction, la liqueur s'est montrée optiquement vide ; le soufre s'y trouvait donc à l'état de solution vraie ; le précipité est apparu ensuite subitement par sursaturation de la liqueur en soufre.

Colloïdes métalliques

Nous croyons devoir insister un peu sur l'examen ultra-microscopique des métaux colloïdaux, parce que chacun d'eux peut être pris comme *test-objet* de la méthode et que leur étude optique n'est pas dénuée d'intérêt au point de vue de leur emploi en thérapeutique

Les solutions colloïdales des métaux peuvent être obtenues par la voie chimique d'après l'une des méthodes indiquées par Carey Léa, Crédé. A. Trillat, ou par un procédé purement physique comme l'a fait Bredig.

Ce sont les solutions de Bredig que nous avons surtout étudiées. Elles sont obtenues en faisant jaillir au sein d'un liquide, l'eau distillée, par exemple une série d'étincelles entre deux électrodes du métal dont on veut obtenir le colloïde. Le choc produit par l'étincelle désagrège le métal en une fine poussière qui reste en suspension dans l'eau ; celle-ci se colore peu à peu, à mesure que l'opération se prolonge. Au bout d'un temps plus ou moins long, suivant l'intensité du courant et le voltage aux électrodes entre lesquelles l'arc jaillit, le liquide devient extrêmement foncé et sa transparence disparaît si l'opération est poussée au maximum. A ce moment, le métal cesse de se tenir en suspension et il se forme une boue métallique qui va en augmentant. On constate d'ailleurs souvent, dès le début de l'opération, un dépôt d'esquilles métalliques trop grosses puisqu'elles restent sur le filtre en papier. La liqueur obtenue est absolument homogène à l'œil nu ; lorsqu'elle

est bien préparée, le microscope ordinaire n'y révèle rien.

Argent colloidal. — L'argent colloidal de Bredig fournit l'une des plus belles préparations qui puissent être vues à l'ultramicroscope. Sur un fond noir se détachent des particules extrêmement brillantes et d'autant plus nombreuses que la liqueur est plus concentrée.

Ces corps ultramicroscopiques, ces particules d'argent sont animées de mouvements oscillatoires qui les font s'entre choquer violemment les unes contre les autres. L'amplitude des mouvements est d'autant plus étendue que les particules sont elles-mêmes plus petites ; le fait peut être constaté sur une même préparation qui contient toujours des particules de différentes grandeurs (1). Ainsi se trouvent confirmées les recherches de Gouy, sur les mouvements browniens.

Nous retrouverons ces mouvements dans toutes les préparations de ce genre ; en particulier dans l'étude des colloïdes organiques, mais ils seront dans beaucoup de cas moins accentués. On doit faire intervenir ici la notion de la densité des particules et les conditions physiques du milieu.

En effet, l'amplitude des mouvements varie avec la nature des liquides que l'on examine. C'est ce que nous avons vérifié de la façon suivante. Nous avons préparé par

(1) Cette inégalité dans les dimensions des particules a pour conséquence la formation de couches superposées au sein du colloïde d'argent lorsqu'on le laisse reposer dans un récipient : les plus grosses particules occupent le fond du vase, les plus petites forment les couches supérieures.

le procédé de Bredig, une solution d'argent colloïdal dans l'eau pure, une autre dans un mélange à parties égales d'eau et de glycérine, et une troisième dans la glycérine pure en opérant sur une même quantité de liquide et dans les mêmes conditions de durée, d'intensité et de voltage (1).

Nous avons examiné les trois solutions ainsi obtenues, nous en avons comparé les particules : leurs mouvements d'une très grande amplitude dans l'eau pure, se trouvaient considérablement réduits dans le mélange eau-glycérine, et n'étaient plus perceptibles dans la glycérine pure. Ces différences semblent être en relation directe avec les différences de viscosité que présentent les liquides utilisés.

L'argent colloïdal obtenu dans l'eau distillée par le procédé de Bredig, se conserve assez longtemps à l'abri de l'air et de la lumière. On peut le soumettre à l'ébullition sans le modifier d'une façon remarquable. Il n'en est pas de même lorsqu'on y ajoute seulement une trace d'un sel tel que le chlorure de potassium, la liqueur change de couleur, elle devient plus grise et l'ultramicroscope montre que sa constitution est profondément modifiée. C'est à peine si l'on observe encore quelques particules isolées et continuant à se mouvoir ; le champ du microscope est parsemé de grosses taches lumineuses, d'aspect muriforme et constituées par des amas de particules. Ce phénomène est intéressant à signaler, car on le retrouve toutes les fois que l'on étudie un colloïde précipité ou coagulé.

(1) En opérant avec la glycérine, on obtient une mise en liberté de charbon résultant d'une décomposition produite par l'étincelle : mais ce charbon monte à la surface du liquide et reste sur le filtre.

Ainsi l'addition d'une très faible quantité de chlorure de potassium a suffi à bouleverser la constitution du colloïde d'argent et cela d'une façon définitive.

Il n'est d'ailleurs pas nécessaire d'avoir recours aux réactifs pour voir le colloïde changer sa constitution : une solution colloïdale abandonnée à elle-même se transforme sans cesse, elle se trouble ou se coagule, change de couleur et arrive à présenter à l'ultramicroscope le même aspect que précédemment.

L'état colloïdal n'est donc pas stable. A ce point de vue M. J. Duclaux a pu soutenir que les propriétés des colloïdes étaient d'ordre biologique « La matière vivante, dit l'auteur se transforme aussi sans tendre vers aucune limite : une spore par exemple, se modifie avec une lenteur extrême, mais on ne peut l'amener à un état qui soit stable. L'évolution de la matière vivante est déterminée à chaque instant, comme celle de colloïdes, par tous ses états antérieurs comme si sa vie écoulée lui donnait une volonté propre. Si nous essayons de l'amener plus vite à l'un des états par lesquels elle passera plus tard nous forçons son évolution et elle y arrive avec des propriétés différentes ».

L'argent colloïdal employé en thérapeutique ou « col-largol » est obtenu par la voie chimique et revêt, lorsqu'il est desséché, la forme de petits grains brun-rougeâtres. Plongés dans l'eau, ces grains disparaissent rapidement en donnant naissance à une liqueur plus ou moins foncée suivant la concentration. L'argent colloïdal obtenu dans ces conditions n'est pas pur ; il contient des matières organiques du fer, de l'acide sulfurique. D'après M. J. Duclaux

c'est grâce à ces impuretés qu'à l'inverse d'autres colloïdes, le collargol, ne perd pas sa solubilité par dessiccation.

Vues à l'ultramicroscope, les solutions de collargol présentent des particules de couleur rougeâtre et dont les dimensions semblent très variables.

Presque toujours on constate aussi la présence de grumeaux dont le nombre acquiert de l'importance à mesure que la solution vieillit. L'action de la chaleur paraît plus marquée ici que dans la solution de Bredig : si l'on soumet le collargol à l'ébullition prolongée il se précipite presque totalement.

Nous avons examiné des solutions utilisées en injections intra-veineuses et nous avons pu constater que certaines d'entre elles étaient précipitées ; les particules avaient perdu tout mouvement et formaient des amas que l'aspect macroscopique de ces solutions ne laissait prévoir en aucune façon. Ce fait mérite de retenir l'attention au point de vue pratique car plus d'une déconvenue pourra se produire par l'usage de solutions déséquilibrées.

Le mode d'action de ces substances auxquelles Bredig a donné le nom de ferments métalliques n'est pas encore bien connu. Les métaux à l'état colloïdal se comportent comme de véritables ferments ; ils accélèrent par leur présence des transformations chimiques de même ordre que celles dans lesquelles interviennent les ferments figurés et les ferments organiques.

En tous cas l'action physiologique de ces colloïdes paraît liée à l'état de division extrême du métal et par là même à l'étendue de sa surface libre : il s'agit ici d'une propriété analogue à celle que présente la mousse de pla-

tine. Il y a donc intérêt à n'employer en thérapeutique que des solutions contenant de très fines particules, animées de mouvements browniens (colloïdes vivants); les solutions précipitées (colloïdes morts) doivent être rejetées.

Le glycogène.

Le glycogène se dissout dans l'eau à l'état colloïdal. C'est là un fait qui a été nettement démontré par les recherches ultra-microscopiques de Zsigmondy, Raehlmann, M^e Gatin-Gruzewska et Wilhem-Biltz.

Une solution de glycogène à 1 p. 100 se présente à l'ultra-microscope avec les caractères suivants : sur le fond de la préparation apparaissent de très nombreuses particules blanches, petites, animées de mouvements propres d'une moins grande amplitude que ceux des particules métalliques. Certaines particules de glycogène sont difficilement perceptibles, leur éclat est en partie effacé par les rayons lumineux émanant du fond de la préparation, car ici le fond n'est pas noir mais assez fortement lumineux, il présente une teinte blanc-bleuâtre, lactescente.

A quoi est due cette coloration ? Il ne s'agit pas ici de fluorescence, car en interposant entre l'œil et la préparation une série d'écrans colorés, on voit que la trace lumineuse ne s'éteint pour aucune couleur. C'est donc un phénomène de diffusion analogue à celui qui nous permet de distinguer les particules dont nous venons de parler. Dans le cas présent, on a encore affaire à des particules extrê-

mement serrées et trop petites pour être distinguées. Suivant une heureuse comparaison, le fond de la préparation représente une « *voie lactée* » de points individuellement trop peu lumineux pour être aperçus.

Il était intéressant de comparer des solutions de concentrations différentes, c'est ce qu'a fait Raehlmann. Avec une solution dix fois plus faible que la précédente, le fond de la préparation a conservé son même aspect lumineux : les grosses particules visibles sans effort sont moins nombreuses.

Une solution à 1 p. 300.000 présenterait encore des particules distinctes, mais le fond de la préparation ne serait plus lumineux. Nous ne pouvons confirmer ces données.

En ce qui concerne les mouvements des particules, Raehlmann constate que leur amplitude et leur énergie dépendent non seulement de leur masse, de leurs dimensions et de leur poids spécifique, mais aussi de leur quantité. « Plus la solution est diluée, dit-il, moins les mouvements sont énergiques. Si la dilution est très considérable, les mouvements s'arrêtent tout à fait et les particules flottent simplement dans la goutte d'eau. C'est pour cette raison que je ne considère pas ces mouvements comme des mouvements browniens, mais comme l'expression d'une force de gravitation, force en vertu de laquelle les particules s'attirent ou se repoussent ».

Cette constatation n'est pas, à notre avis, irréfutable. D'abord l'œil est d'autant plus vivement impressionné que les particules sont plus nombreuses, et l'on peut ainsi se faire illusion sur l'amplitude des mouvements. D'autre

part, on ne peut rien conclure de solutions aussi diluées que celles dont parle l'auteur ; étant donnée la difficulté de trouver des liquides de dilution absolument purs, nous sommes convaincu que les rares particules flottant dans la goutte d'eau sont tout simplement des impuretés en suspension.

Les solutions de glycogène changent d'aspect avec le temps et s'appauvrissent en particules visibles. Une solution à 1 p. 100 nettement opalescente à l'état frais, devient plus claire au bout de quelque temps. Après trois jours les particules deviennent tout à fait indistinctes à l'ultramicroscopique, mais le fond de la préparation reste lumineux.

Raehlmann a pu étudier une transformation analogue directement sous le microscope, en s'appuyant sur ce fait que le glycogène, par l'action de certains ferments se transforme en dextrine et glucose. A une solution de glycogène suffisamment concentrée, l'auteur ajoute quelques gouttes d'une solution de diastase au 1/20. Il assiste ainsi à la désagrégation des particules qui deviennent de plus en plus petites pour finalement disparaître. Cette expérience nous aide à comprendre comment le glycogène si péniblement diffusible peut cependant être résorbé dans l'organisme, les dimensions des particules devenant de plus en plus en plus réduites.

La présence d'impuretés ne semble pas modifier l'aspect des solutions de glycogène. Le chlorure de sodium que l'on rencontre toujours dans le glycogène de commerce ne paraît pas avoir d'influence sur la constitution des solutions. De même, le réactif spécifique du glycogène, la

tetnure d'iode diluée n'a aucune modification dans l'aspect de la solution.

En revanche, les agents de précipitation tels que l'acide acétique et surtout l'alcool, donnent naissance à de belles images ultramicroscopiques qui se modifient au fur et à mesure que l'on ajoute le réactif (Wilhem Biltz).

Hémoglobine

Par leurs propriétés optiques, les solutions d'hémoglobine se rapprochent un peu de celles du glycogène. Une solution d'hémoglobine à 1 p. 1000, examinée lorsqu'elle vient d'être préparée, se présente à l'ultramicroscope avec les caractères d'une solution colloïdale ; un grand nombre de particules apparaissent dans le liquide, revêtent une teinte rouge et sont animées de mouvements très marqués.

La même solution, examinée vingt quatre heures après, présente déjà beaucoup moins de particules visibles et au bout de quarante-huit heures, elle ne semble plus en présenter aucune. Le même phénomène a déjà été observé pour le glycogène. S'agit-il ici d'une transformation chimique ? En d'autres termes, ce changement d'aspect est-il dû à la formation de parahémoglobine ou d'hématine ? Nous ne le croyons pas, car la solution étudiée à l'ultramicroscope présente encore au bout de deux jours, le spectre caractéristique de l'hémoglobine, la bande d'absorption de Stokes. Ce fait paraîtrait confirmer les idées de Van Bemmelen (1), qui admet le passage par transformation lente de l'état colloïdal à l'état cristallisé.

(1) Van Bemmelen. Zeit. anorg. chem. 18, 98, 1898.

Urine

Urines normales. — L'urine normale ne paraît pas bien se prêter à l'examen ultramicroscopique. En dehors des éléments figurés, visibles au microscope, elle contient en effet, des débris cellulaires qui apparaissent sous forme de taches lumineuses de dimensions variables. Ces corps étrangers en suspension, n'ont pas de mouvements propres et se déplacent en masse grâce aux courants qui se produisent au sein du liquide.

Mais, en dehors de ces impuretés, l'urine ne paraît pas contenir, à proprement parler, de corps ultramicroscopiques et en tout cas ne présente pas les caractères d'une solution colloïdale. Cette constatation s'explique très bien si l'on songe que la plupart des matières extractives de l'urine, sont des cristalloïdes et forment par conséquent des solutions vraies. En cela, l'excrétion urinaire peut être opposée, comme nous le verrons, à la plupart des autres liquides provenant de l'organisme, en particulier aux sécrétions qui toutes sont colloïdales.

On a fait remarquer à ce sujet que l'état cristalloïdal semble en quelque sorte incompatible avec la vie; l'organisme vivant tend à se débarrasser des cristalloïdes. Les qualificatifs de *statique* et de *dynamique*, appliqués, le premier à l'état cristalloïdal, l'autre à l'état colloïdal, traduisent un même ordre d'idées.

Urines albumineuses. — Les urines albumineuses, comparées à des urines normales, ne nous ont pas paru

présenter des différences bien caractéristiques. Tel n'est pas l'avis de Much, Römer et Siebert. Ces auteurs constatent que les urines albumineuses présentent des particules ultramicroscopiques, en plus grand nombre que les urines normales. Ils ont entrepris des recherches quantitatives et ont voulu instituer un nouveau procédé de dosage de l'albumine, au moyen de l'ultramicroscope.

Leur procédé de numération peut s'appliquer à tous les liquides ; il consiste à diluer les solutions jusqu'à ce *qu'elles ne contiennent plus que deux ou trois particules visibles dans le champ du microscope*. Ils ont appelé « valeur ultra » le titre de cette dilution. Par exemple, si, pour n'obtenir que deux ou trois particules visibles par champ, ils ont dû ajouter à 1 volume d'urine, 10 volumes d'eau distillée, la « valeur ultra » sera représentée par 1 : 10.

D'après les auteurs, cette « valeur ultra » est de 1 : 25 à 1 : 60 pour l'urine normale, de 1 : 200 à 1 : 400 pour l'albuminurie légère, de 1 : 500 à 1 : 15,000 pour l'albuminurie forte. Nous n'avons pu répéter ces expériences, qui exigent l'appareil de Siedentopf et Zsigmondy.

Les particules rencontrées dans l'urine normale seraient de la mucine, mais encore une fois on pourrait tout aussi bien avoir à faire à des éléments étrangers en suspension dans l'urine ou dans le liquide de dilution. En ce qui concerne l'albumine, son dosage à l'ultramicroscope serait l'égal de la polarisation pour le sucre. Cette assertion ne saurait être admise sans réserves. En effet, nous allons voir que les solutions albumineuses ne semblent pas se prêter à une étude ultramicroscopique précise.

Albumine

L'albumine du blanc d'œuf examinée à l'ultramicroscope ne présente que très peu de particules visibles. Le fond de la préparation n'est que très faiblement éclairé ; il n'y a pas de « voie lactée très accentuée ». On ne doit cependant pas en conclure que l'albumine pure ou en solution constitue un milieu homogène, c'est-à-dire dont la composition est la même en tous les points. Si l'on ne voit à peu près rien à l'ultramicroscope c'est probablement parce que les particules d'albumine et le milieu qui les contient ont le même indice de réfraction : dans ces conditions les rayons lumineux ne sont plus diffractés par les particules et ne viennent plus impressionner l'œil.

Si l'on soumet une solution d'albumine à l'action lente et progressive de la chaleur, on voit le nombre des particules augmenter graduellement. D'après Raehlmann, la chaleur a produit l'agglutination de particules existant déjà dans le liquide mais isolément trop petites pour être vues, ou bien l'indice de réfraction des molécules d'albumine a été modifié et est devenu différent de celui du liquide.

Nous croyons que les deux explications se complètent mutuellement. En effet, la chaleur fait bien apparaître des espèces de grumeaux, qui semblent nettement constitués par des amas de particules ; mais à côté de ces amas on constate la présence d'une infinité de grains très réguliers et de plus petites dimensions que les particules déjà visibles avant le chauffage.

D'ailleurs, les points lumineux constatés dans une solution d'albumine, avant qu'elle n'ait été soumise à l'action de la chaleur, sont probablement constitués aussi par des amas de particules très fines. Ces taches lumineuses n'ont pas l'aspect de grains que l'on rencontre dans les autres colloïdes ; ils sont plus gros, plus irréguliers, plus inégaux entre eux. Autre fait plus important : leur nombre augmente avec le temps, ce qui semble en rapport avec la coagulation lente que subissent à la longue les colloïdes.

En résumé les particules visibles dans une solution d'albumine, semblent constituées par des amas plus ou moins volumineux, de très fines particules. Dans ces conditions la numération des grains visibles ne saurait avoir de valeur précise.

Le Lait (1)

Le lait contient, en dehors du beurre et des éléments salins, la caséine qui, d'après Duclaux, paraît formée de deux parties ; l'une de gros grains qui seraient en suspension et l'autre qui serait en solution dans le liquide séreux du lait ; il y aurait en un mot la caséine colloïdale et la caséine dissoute.

L'ultra-microscope permet de voir que la caséine est formée d'un nombre infini de grains, invisibles pour la plupart avec les plus forts grossissements du microscope. En sorte que l'examen ultra-microscopique vient mettre en doute l'idée qu'une partie de la caséine est solubilisée : le lait est un colloïde de la caséine qui contient en suspension des globules de beurre.

Pour se convaincre facilement de la structure ultra-microscopique de la caséine, il suffit de débeurrer le lait à l'aide du centrifugeur ; de prendre une goutte de lait ainsi débeurré et de l'examiner successivement à l'éclairage direct et à l'éclairage oblique. Dans le premier cas, on ne voit presque rien ; dans le second, on aperçoit une grande quantité de grains. La centrifugation a pour but d'enlever le beurre, elle n'influe en rien sur la constitution

(1) Les résultats que nous publions relativement au lait ont été obtenus par MM. Lesage et Dongier qui feront paraître prochainement un travail sur ce sujet. — Nous les remercions d'avoir bien voulu nous les communiquer.

de la caséine, comme on peut s'en convaincre par l'étude du lait nature non centrifugé.

Quand on examine une goutte de lait ainsi débeurré, sans lui avoir fait subir de dilution, on s'aperçoit que la quantité des grains est beaucoup trop considérable. Pour qu'il soit facile d'en étudier la structure on doit étendre le lait. On ajoute par exemple une goutte ou deux de lait centrifugé à 40 centimètres cubes d'eau distillée. On voit alors que les éléments de la caséine du lait cru présentent des *mouvements browniens*, sont *miroitants*, sont *pâles*, *sans relief*, de sorte que les contours des grains ne forment pas avec le milieu ambiant une ligne de démarcation bien nette. Le grain de caséine de lait cru donne l'impression visuelle d'être entouré d'une petite zone nébuleuse, si bien que tous les grains étant les uns à côté des autres, le liquide qui les sépare présente une teinte blanchâtre, laiteuse.

Les grains paraissent à l'œil de volume sensiblement égal pour un même lait. A défaut de procédés de mensuration, on ne peut parler ici que d'impressions visuelles, mais il semble cependant que les dimensions des particules varient avec les différents laits. Les plus petits grains se rencontrent dans le lait de femme ; ils sont plus gros dans le lait d'ânesse, de vache, et acquièrent le maximum de dimension dans le lait de chèvre.

Si l'on cherche un terme de comparaison entre le colloïde du lait et les colloïdes métalliques ; les grains de caséine paraissent beaucoup plus réguliers et beaucoup plus petits que les particules métalliques. D'où il résulte

que des différentes espèces de lait, c'est le lait de chèvre qui se rapproche le plus du colloïde d'argent.

On peut donc conclure que le lait est formé d'eau contenant une quantité constante de sels dissous ; car d'après les recherches de Winter, qui a montré la stabilité de la concentration moléculaire, l'abaissement du point de congélation est le même pour les différents laits ($\Delta = 0^{\circ} 56$). Ce liquide salin contient en suspension de la caséine à l'état colloïdal.

Le lait ne contient pas d'albumine solubilisée, car il ne coagule pas par la chaleur, et de plus, quand on examine les particules de caséine, on s'aperçoit qu'elles ont un mouvement propre d'une très grande amplitude ; le liquide qui les contient est donc franchement aqueux et ne présente pas de viscosité (1). Ce sont les zones nébuleuses de chaque grain qui donnent au lacto-sérum l'apparence d'un liquide albumineux. Pour l'en convaincre il suffit d'étudier l'action du chauffage.

Lait cuit. — Si l'on examine du lait débeurré porté à l'autoclave à 115 degrés voici ce que l'on observe.

Le milieu liquide salin n'est plus éclairé, n'est plus lactescent mais franchement noir.

Chaque grain qui avait dans le lait cru des contours vagues, nébuleux, devient plus sphérique, plus précis et possède un contour nettement délimité ; en un mot le grain se coagule. Alors le lait prend l'aspect du colloïde d'argent et ce changement d'aspect est d'autant plus net que le fond de la préparation devient noir.

Il est à noter en outre que les grains ne miroitent plus

(1) Voir page 39.

mais donnent l'impression de relief. En se coagulant enfin le grain de lait cru prend plus de consistance et semble plus gros. Les grains apparaissent plus séparés les uns des autres que dans le lait cru.

L'action de la chaleur sur le lait est d'autant plus marquée que la température s'élève. Les différences que nous venons de signaler présentent leur maximum de netteté pour le lait chauffé à 120°.

Action de la filtration. — Duclaux avait remarqué depuis longtemps que si l'on filtre du lait sur une bougie Chamberland une grande partie de la caséine reste sur le filtre. Le fait peut être contrôlé par l'ultramicroscope ; il suffit de comparer la préparation avant et après la filtration. Le filtre enlève les neuf dixièmes de la caséine.

Action de la potasse. — On sait que la caséine est solubilisée par une solution alcoolique de potasse (1 gr. de potasse pour 100 gr. d'alcool). Que l'on ajoute à 100 grammes de lait, un tiers ou un quart de cette solution et que l'on pratique ensuite l'examen ultramicroscopique on ne voit plus rien : la caséine s'est solubilisée.

Action du suc gastrique (gastérine de Frémont). Si l'on ajoute du lait cru à de la gastérine dans la proportion d'une goutte ou deux de lait pour dix centimètres cubes de gastérine, le colloïde disparaît. A cette dose il y a solubilisation. Or si l'on fait la même expérience avec du lait chauffé à 120 degrés la solubilisation est beaucoup plus lente et beaucoup moins marquée.

Si l'on augmente la proportion de lait, on arrive à obtenir des amas muriformes. C'est une coagulation. Si par

exemple à 5 gouttes de lait on ajoute une goutte de gastérine on obtient une coagulation en masse.

En résumé la caséine est précipitée par le suc gastrique en petite proportion et soluble dans un excès. D'où l'on pourrait conclure que pour bien absorber le lait *il faut le prendre chaque fois par petites quantités.*

Sérum sanguin

Quand on prend du sérum sanguin provenant d'une espèce quelconque et qu'on l'examine au microscope on ne voit rien même avec les plus forts grossissements. Vu à l'ultramicroscope, ce même sérum apparaît très nettement avec les caractères d'un colloïde.

Caractères du colloïde sérique. — Le colloïde sérique est formé d'un nombre considérable de grains, très petits, très réguliers et paraissant avoir des dimensions sensiblement égales. Les mouvements browniens sont ici moins marqués que dans le cas du lait, ce qui peut s'expliquer de la façon suivante : Le lait, avons-nous dit, ne précipite pas par la chaleur et ne renferme, par conséquent, pas d'albumine solubilisée ! au contraire, le sérum sanguin précipité renferme de l'albumine en solution, d'où sa viscosité plus grande, viscosité qui a pour effet de réduire les mouvements des particules (1).

D'ailleurs, le fond de la préparation est lactescent, et cette lactescence rend moins nette la vision des particules, qui ne se détachent plus ici sur un fond noir.

Existe-t-il une différence entre le grain lacté et le grain sérique ? On ne saurait l'affirmer, cependant on peut noter que les grains de sérum paraissent plus petits à l'œil que les grains du lait et aussi plus réguliers et plus égaux entre eux comme le laissait déjà prévoir le fait suivant : le col-

(1) Voir page 39.

loïde sérique abandonné à lui-même pendant longtemps, ne semble pas se déposer ni former dans le récipient une série de couches superposées ; les couches supérieures correspondent aux grains les plus petits et les inférieures aux plus gros. Tel est le cas du colloïde d'argent dont l'inégalité des grains est manifeste (1) ; tel est aussi le cas de la caséine. La présence de couches superposées dans le lait abandonné au repos, a été signalée depuis longtemps par les auteurs qui sont partis de ce fait pour admettre différentes variétés de caséine. Il ne s'agit, en réalité que d'une inégalité de volume des grains.

Le sérum sanguin paraît donc avoir des grains égaux entre eux ; c'est là, un premier caractère qui le différencie du lacto-sérum. En outre, le sérum sanguin contient de l'albumine, puisqu'il coagule par la chaleur ; le lacto-sérum, au contraire, n'en contient pas.

Dans l'état actuel, il paraît difficile de différencier à l'ultramicroscope des sérums émanant d'espèces différentes : Much, Romer et Siebert ont recherché la « valeur ultra » (2) de différents sérums ; ils ont trouvé que pour une même espèce, cette valeur n'était pas constante dans les recherches portant sur le sérum de trois chevaux, elle a pu être représentée par des nombres variant dans la proportion de 1, $\frac{4}{5}$ et $\frac{3}{5}$.

Sérums antitoxiques

Les divers sérums immunisés (*sérums antidiphthérique, antitétanique, etc.*), n'ont pas entre eux, au point de vue

(1) Voir la note de la page 38.

(2) Voir page 47.

optique, de caractères différentiels nettement tranchés. Comme tous les colloïdes, les sérums en question se transforment en vieillissant ; ils se troublent ou se coagulent : l'ultramicroscope y révèle la présence de particules de plus en plus grosses qui sont en réalité des points de coagulation, invisibles à l'œil et au microscope.

Comparés aux sérums non immunisés, les sérums fortement immunisés (sérum antidiphthérique), semblent présenter un plus grand nombre de particules ; c'est là, tout au moins, une impression visuelle que nous avons notée mainte et mainte fois.

D'autre part, Much, Römer et Siebert, on fait des recherches quantitatives et ont pu réduire le nombre des particules à deux ou trois par champ de microscope, en diluant :

1° Un sérum de cheval non immunisé à 1 p. 100.000.

2° Un sérum de cheval immunisé à 1 p. 300.000.

Dans le cas particulier la « valeur ultra » du sérum immunisé était donc trois fois plus grande que celle du sérum non immunisé.

Différentes expériences des mêmes auteurs tendraient à prouver que le pouvoir bactéricide du sérum est en relation directe avec le nombre des particules. On sait que si l'on fait passer un courant électrique dans une solution colloïdale, il y a une sorte de répulsion par l'un des pôles : les particules se meuvent en masse vers l'autre pôle (transport électrique).

Much, Römer et Siebert remplissent un tube en U, de sérum qu'ils soumettent à l'action d'un courant de faible

intensité (0,5 Ampère) pendant une demi-heure, après quoi ils examinent successivement le sérum de l'anode et le sérum de la cathode. Voici les résultats obtenus dans l'une de leurs expériences :

Sérum normal (non électrisé), valeur ultra	=	1/ 200.000
Sérum de l'anode	—	= 1/7.000.000
— de la cathode	—	= 1/ 80.000

C'est donc vers l'anode que se portent les particules. D'autre part le pouvoir bactéricide, déterminé au colibacille, atteint son maximum pour le sérum de l'anode. Ce pouvoir est pour ainsi dire nul à la cathode, si l'on a pris soin de ramener le sérum cathodique au titre alcalin du sérum originel.

CONCLUSIONS

Les recherches physiques poursuivies dans ces dernières années ont fait connaître une nouvelle méthode d'examen des liquides, permettant d'en voir la constitution alors que les plus forts grossissements du microscope ne donnent aucun résultat. C'est l'étude des corps ultra-microscopiques ; l'appareil peut-être appelé *ultra-microscope*.

Cette méthode d'investigation optique est un moyen d'étudier les colloïdes.

Les colloïdes inorganiques sont formés d'éléments ultra-microscopiques présentant le mouvement brownien : ces éléments sont de nombre et de volume variables.

Même application pour les colloïdes organiques. Aussi l'étude du lait, du sérum sanguin bénéficie pour une large part de l'emploi de l'ultra-microscope.

On peut aussi approfondir davantage la constitution intime des liquides biologiques : en montrer optiquement les transformations suivant les différents facteurs. (De là

l'étude du sérum normal et du sérum chauffé, du lait cru et du lait stérilisé).

La méthode comporte de sérieuses difficultés de technique et son emploi paraît jusqu'ici assez limité.

Vu : LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
ROGER.

Vu : LE DOYEN,
DEBOVE.

Vu et permis d'imprimer :

LE VICE-RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS
L. LIARD.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBE. — A suggestion looking toward ultramicroscopy.
Science N. Y. et Lancaster Pa., 1904. N. S., XX. 844.
- ARON. — Ueber Sicht barmachung ultramikroskopischer
Theilchen, *Med. Voche.*, Berl., 1903. IV. 299.
- BILTZ (Wilhelm). — Ultramikroskopische Behbaotungen.
- BREDIG. — Anorganiche fermente. Leipzig, 1901.
- COTTON et MONTON. — Les objets ultramicroscopiques. *Rev.
Gén. des Sciences*, 15 déc. 1903.
- Etude directe du transport dans le courant, des particules
ultramicroscopiques. Comptes rendus, Académie des
Sciences. Paris, 1904.
- Compte rendu, Académie des Sciences (séance du 29 juillet
1903, p. 4657 et Société française de physique (séance du 3
juillet 1903).
- DUCLAUX (Jacques). — Les colloïdes. *Thèse*, Fac. des Sciences,
Paris, 1904.
- EHRENHAFT. -- Das optische Verhalten der metalkolloïde und
deren Teilchengrösse. *Annalen der Physik* (1903). t. XI,
p. 489.
- GOUY. — Etude sur la diffraction. *Annales de Chimie et de
Physique*, t. XIII, 1886.

- Les mouvements browniens. *Rev. Gén. des Sciences*, 1895, p. 1.
- HARDI. — Colloidal solution the globulin system. *Proc. Physiology Soc. Lond.*, 1903, t. XXVI.
- HENRY (V.) et MAYER (A.) — *Revue Générale des Sciences*, 1^{er} nov. 1904, n° 22. Nos connaissances sur les colloïdes.
- HEWLET (R.-T.) — The limites of microscopical visibility ; microorganisms that are invisible I state *M. Lond.*, 1903. XI, 344-347.
- HÖBER. — *Physikalische chemie der Zelle und der Gewebe*. Leipzig, W. Engelmann (1902).
- MICHAELIS. — Ultramikroskopische untersuchungen. *Deutsch Med. Wehnscher*. Leipzig et Berlin, 1904, XXX, 1534.
- MOUTON. — *Bull. de l'Institut Pasteur*. Paris, 1903, p. 1, 97, 102.
- MUCH RÖMER et SIEBERT. — Ultramikroskopische untersuchungen *Ztschr. f. diatet. U. physik, therap. Leipz.*, 1904. XIII, 19, 27, 94.
- RAEHLMANN. — Die ultramikroskopische untersuchungen nach H. Siedentopf et Zsigmondy und ihre anwendung zur Beobachtung lebender mikroorganismen. *Munich med. Wehnschr*, 1904, 1, 58-60.
- Bisherige resultate der ultramikroskopischen untersuchung. *Ztschr. f. Arztt. Fortbild. jena*, 1904, 1, 120-124.
- Ueber ultramikroskopische untersuchungen von glycogen albuminsubstanzen und bacterien. *Berl. Klin. Wehnschr*, 1904. XII, 862-866. N° 32, août 1904.
- *Berl. Klin. Wehnschr*, 1904. XII, 186-190. Also (abstr) *Munchen Wehnschr*, 1904. LI, 321.
- SIEDENTOPF. — Über die physikalischen Principien der Sicht barmachung ultramikroskopischer Teilchen. *Berliner Klinischen Wochenschrift*, 1904. N° 32.
- SIEDENTOPF et ZSIGMOUDY. — *Annalen der Physik*, 4 folge. Bud. 10, 1903.
- *Drude Ann.*, LX, 1903.

STODEL. — Etude sur les colloïdes. *Rev. Scientifique*, 7 janvier 1905.

A. ROBIN et J. BARDET. — Les ferments métalliques. *Rev. Scientifique*, 11 fév. 1905.

ZSIGMONDY. — *Licbig's Ann.*, 301, 29 (1898).

